

## **КОНТРОЛЬ ВМІСТУ МЕТІОНІНУ ГІДРОКСИАНАЛОГУ В КОРМОВИХ ДОБАВКАХ МЕТОДОМ КАПІЛЯРНОГО ЕЛЕКТРОФОРЕЗУ**

*І. Я. Коцюмбас, Т. Р. Левицький, Г. П. Ривак*

Державний науково-дослідний контрольний інститут ветеринарних препаратів  
та кормових добавок  
вул. Донецька, 11, м. Львів, 79019, Україна

*У статті наведено результати визначення вмісту гідроксианалогу метіоніну в кормових добавках методом капілярного електрофорезу за допомогою приладу «Капель-105/105М», обладнаного спеціальним програмним забезпеченням на основі персонального комп'ютера. Впровадження методу є особливо актуальним у зв'язку з постійним поповненням ринку України новими амінокислотними кормовими добавками та збільшенням випадків їх фальсифікації. Валідаційні дані, результати досліджень, їх аналіз та висновки наведені в статті свідчать, що метод капілярного електрофорезу за допомогою приладу “Капель-105/105М” є альтернативним методом і за своїми характеристиками може застосовуватися при контролюванні якості кормових добавок метіоніну гідроксианалогу за вмістом основної діючої речовини.*

**Ключові слова:** КОРМОВІ ДОБАВКИ, МЕТІОНІН ГІДРОКСИАНАЛОГ, КАПІЛЯРНИЙ ЕЛЕКТРОФОРЕЗ, ВАЛІЖАЦІЯ.

Особливо важливе місце при балансуванні раціонів сільськогосподарських тварин та птиці займає метіонін, який є необхідним у метаболізмі жирів і білків, організм використовує його також для виробництва цистеїну. Метіонін ((S)-2-аміно-4(метилтіо)бутанова кислота) є основним постачальником сульфуру, який запобігає розладам у формуванні волосся, шкіри та нігтів, позитивно впливає на міцність цибулин волосся і підтримує його ріст. Ця незамінна амінокислота сприяє зниженню рівня холестерину, підсилюючи вироблення лецитину печінкою, знижує рівень жирів у печінці, захищає нирки, бере участь у виведенні важких металів з організму, регулює утворення аміаку і очищає від нього сечу, що знижує навантаження на сечовий міхур. Разом з таурином метіонін грає істотну роль у синтезі адреналіну, креатину та інших біологічно важливих сполук. Метіонін служить донором метильних груп при синтезі різноманітних біологічно активних речовин, прискорює загоєння ран [4].

Загальновідомо, що метіонін необхідний для ефективного використання організмом кормів, забезпечення відтворення, росту, повноцінного розвитку і продуктивності, а його дефіцит у раціоні негативно впливає на фізіологічні показники та функціонування організму сільськогосподарських тварин та птиці.

Метіонін міститься в кормових матеріалах рослинного та тваринного походження, однак його біодоступність із кормової сировини не завжди забезпечує необхідну кількість цієї амінокислоти в організмі тварин і птиці, оскільки потреба і використання метіоніну залежать від породи, статі та віку та багатьох інших факторів.

Для балансування раціонів за вмістом метіоніну використовують найчастіше його синтетичні кормові добавки, які добре засвоюються організмом тварин і птиці, та дають позитивні результати, збільшуючи середньодобові прирости і знижуючи витрати кормів на одиницю продукції.

На сьогоднішній день на ринку кормових добавок України представлені наступні джерела метіоніну: DL-метіонін і метіонін гідроксианалог (МНА — Methionine Hydroxy

Analog або за хімічною номенклатурою 2-гідрокси-4-(метилтіо)бутанова кислота, НМТВА). Рідка форма (наприклад, ALIMET®) - Methionine Hydroxy Analog Free Acid (МНА-FA) і суха (наприклад, МНА) — кальцієва сіль 2-гідрокси-4-(метилтіо)бутанової кислоти (МНА-Ca<sup>2+</sup>).

Метіонін гідроксианалог впродовж багатьох років застосовується найбільшими комбікормовими заводами всього світу в якості ефективного джерела метіоніну в кормах тварин [3]. Рідкі продукти, наприклад, ALIMET® (із 88% активністю метіоніну) є зручним в застосуванні джерелом метіоніну. Однак у деяких випадках рідкий продукт використовувати незручно, наприклад за необхідності введення цього компонента в премікси чи комбікорми. На ринку України зареєстрована у встановленому порядку мікрогранульована порошкоподібна кормова добавка під торговою назвою МНА, виробництва фірм США, Китаю тощо.

У складі кормової добавки МНА міститься не менше 84% активного метіоніну та до 12% Са — легкодоступного джерела кальцію в кормах.

Кальцієва сіль сумісна із компонентами кормів і преміксів, зберігає стабільність при введенні в їх склад. У кишечнику тварин сіль дисоціює і вільна кислота НМТВА швидко всмоктується під дією дифузії через клітинну стінку. У всіх тканинах організму вона швидко і ефективно перетворюється в L-метіонін, який бере участь у синтезі білка. Дослідження проведені на птиці, свинях, жуйних і рибах, показали, що МНА є ефективним джерелом L-метіоніну.

Основними пріоритетами МНА є стабільність і нейтральний рівень рН. Однак, в кислому середовищі МНА аналогічно до кальцію форміату (кальцієва сіль мурашиної кислоти, яка часто використовується в складі сумішей органічних кислот) може бути джерелом органічної кислоти.

На сьогоднішній день для контролю якості МНА за вмістом діючої речовини найчастіше використовується метод високоефективної рідинної хроматографії. Однак, цей метод потребує дорогого обладнання і високо чистих реактивів, висококваліфікованого персоналу, що не завжди можна забезпечити на виробництві. Тому, в лабораторії контролю кормових добавок і преміксів ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок впроваджено та валідовано альтернативний метод контролювання МНА за допомогою системи капілярного електрофорезу «КАПЕЛЬ-105/105М».

Метод капілярного електрофорезу дозволяє аналізувати іонні та нейтральні компоненти різноманітної природи з високою ефективністю, оскільки розділення проходить в обмеженому просторі (капілярі) з участю рухомої рідкої фази (буферного розчину), а для реєстрації сигналів використовують подібні принципи детектування та програмної обробки даних, як у хроматографії.

В основі методу закладено електрокінетичні явища — електроміграцію іонів та інших заряджених частинок і електроосмос. Ці явища виникають у розчинах при розташуванні їх в електричному полі, переважно, високої напруги. Якщо розчин знаходиться в тонкому капілярі, то електричне поле, яке знаходиться вздовж капіляра, викликає в ньому рух заряджених частинок і пасивний потік рідини, в результаті чого проба розділяється на індивідуальні компоненти, так як параметри електроміграції специфічні для кожного виду заряджених частинок [1].

Перевагами методу капілярного електрофорезу є: висока ефективність розділення зразка; відсутність колонки, сорбенту; невеликий об'єм аналізованої проби і буферів, при цьому практично непотрібне застосування високочистих, дорогих органічних розчинників.

Метод капілярного електрофорезу з успіхом застосовується для аналізу різноманітних речовин (неорганічних і органічних катіонів і аніонів, амінокислот, вітамінів, барвників, білків тощо) та для технологічного контролю виробництва, вхідного контролю сировини, аналізу фармацевтичних препаратів і харчових продуктів, в криміналістиці, медицині, біохімії тощо.

**Матеріали і методи.** Для контролювання якості кормової добавки метіоніну гідроксианалогу було застосовано метод капілярного електрофорезу, який базується на екстракції проби бідистильованою водою, в подальшому розділенні, ідентифікації і кількісному визначенні масової частки 2-гідрокси-4-(метилтіо)бутанової кислоти кальцієвої солі (МНА- $\text{Ca}^{2+}$ ). Детектування компоненту проводять за індивідуальним поглинанням за довжини хвилі 200 нм. Дослідження проводили за допомогою системи капілярного електрофорезу “Капель-105/105М” із позитивною полярністю джерела високої напруги (внутрішній діаметр капіляру 50 мкм, повна довжина капіляру 75 см, ефективна довжина 65 см), яка обладнана спеціальним програмним забезпеченням на основі персонального комп'ютера. В якості робочого буферного розчину використовували розчин натрію тетраборнокислого, молярною концентрацією 0,02 моль/дм<sup>3</sup> [2].

У період проведення досліджень в приміщенні лабораторії дотримувались наступні умови: температура повітря 23 °С; вологість повітря 65-68%; напруга в мережі 220 В; частота перемінного струму (50±1) Гц.

Для проведення досліджень було взято зразок кормової добавки метіоніну гідроксианалогу 97,0%, вміст метіоніну в якому згідно сертифікату якості становив не менше 84,0% та проведено наступні роботи: підготовка капіляру до роботи, приготування буферних, градуювальних і контрольних розчинів, градуювання системи капілярного електрофорезу “Капель” і підготовка проб.

Для приготування градуювальних і контрольних розчинів використовували стандартний зразок 2-гідрокси-4-(метилтіо)бутанової кислоти кальцієву сіль виробництва фірми «Sigma-Aldrich» (США) торгової марки «Fluka» концентрацією 99,0%.

Аналіз зразків проводили за відповідних параметрів приладу, які наведено в таблиці 1.

*Таблиця 1*

**Параметри приладу “Капель-105/105М” для визначення вмісту МНА**

Параметри	Значення
Введення проби	30 мбар, 10 сек
Довжина хвилі, нм	200
Напруга, кВ	25
Температура, °С	30

**Результати й обговорення.** Для визначення вмісту метіоніну в формі МНА- $\text{Ca}^{2+}$  у кормових добавках метіоніну гідроксианалогу було побудовано градуювальний графік та перевірено його стабільність за допомогою контрольного розчину, аналізуючи не менше двох разів в умовах, відповідних аналізу. Встановлено ширину вікна ідентифікації 5 % і на отриманих електрофореграмах перевірено автоматичну ідентифікацію компонентів.

Отримані дані щодо градуювального графіка та його стабільності наведено на електрофореграмі рис. 1 та табл. 2.

Дані таблиці показують, що відхилення між результатами, отриманими при вимірюванні градуювальних розчинів становлять 0,43-3,2%, що не перевищує 5,0% передбачених методикою.

Дослідження контрольних розчинів при перевірці стабільності показують, що даний метод забезпечує стабільність градуювальних характеристик, відхилення отриманих результатів становлять 1,64-1,8%, що не перевищує 5,0% передбачених методикою.

Результати визначення вмісту МНА- $\text{Ca}^{2+}$  в кормовій добавці у вигляді електрофореграми подано на рис. 2, дані щодо результатів – у таблиці 3.

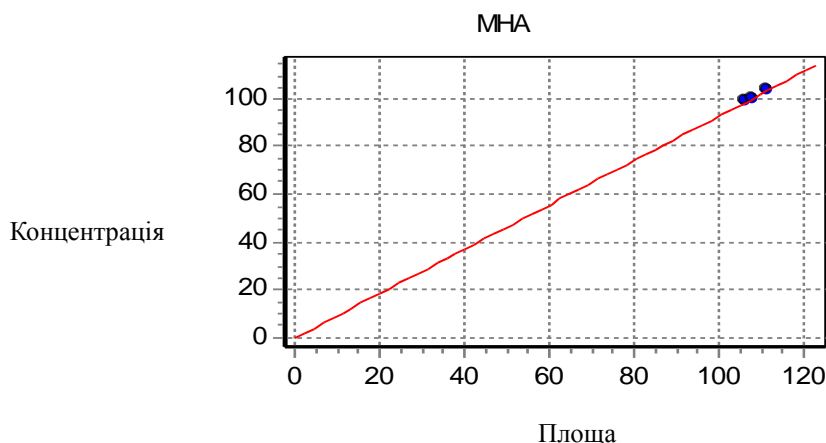


Рис. 1. Градувальний графік для визначення метіоніну гідроксианалогу

Таблиця 2

Дані побудови градувального графіку та визначення його стабільності (n=3)

Назва розчину	Час виходу піку, хв.	Висота піку	Площа піку	Концентрація, мг/л	Відхилення, %
Град. р-н № 1	10,580	3,240	107,8	100,0	0
Град. р-н № 2	10,525	3,306	111,3	103,2	3,2
Град. р-н № 3	10,460	3,183	106,8	99,57	0,43
Контрольний р-н № 1	10,510	3,165	106,2	98,36	1,64
Контрольний р-н № 2	10,536	3,270	110,5	101,8	1,8

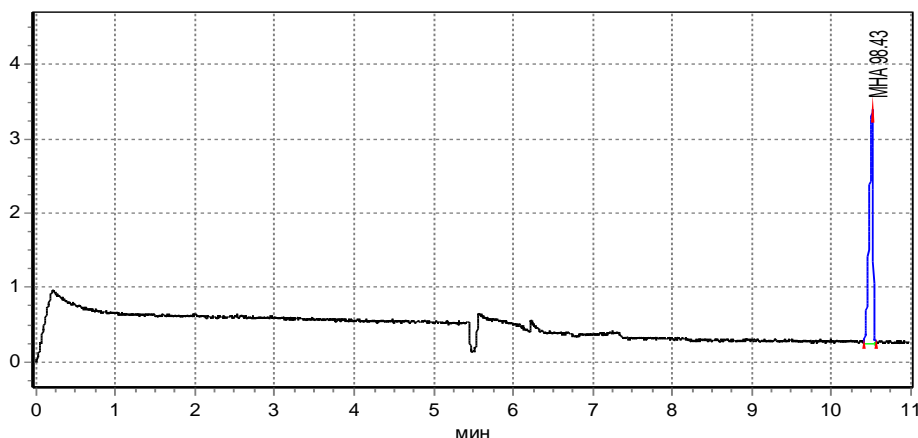


Рис. 2. Електрофореграма результатів умісту МНА- $\text{Ca}^{2+}$  в кормовій добавці

Для проведення оцінювання придатності методу (валідації) було проаналізовано кормову добавку метіоніну гідроксианалогу в 10 повторностях в умовах відповідних даному аналізу. Розраховано середнє арифметичне ( $X_{\text{сєр}}$ ) з 10 визначень, стандартне відхилення SD, за допомогою коефіцієнту Стюдєнта обчислено довірчий інтервал для  $X_{\text{сєр}}$  при  $\alpha = 5\%$ ,  $n = 10$ . За відповідними формулами знайдено відносне стандартне відхилення (RSD), встановлено точність, лінійність, збіжність та стандартну невизначеність даного методу. Також при отриманні валідаційних даних було застосовано контрольні карти Шухарта і карти кумулятивних сум.

**Валідаційні дані щодо результатів визначення вмісту МНА-Са<sup>2+</sup> в кормовій добавці метіоніну гідроксианалогу**

№ п/п	Показники	Значення
1	Кількість спостережень (n)	10
2	Середнє значення ( $X_{\text{сер}}$ ), мг/л	96,2
3	Стандартне відхилення (SD), мг/л	4,79
4	Відносне стандартне відхилення (RSD), %	4,98
5	Точність повернення, %	98,8
6	Довірчий інтервал ( $\alpha=5\%$ , $n=10$ ) вмісту, мг/л	85,53-106,87
7	Коефіцієнт Стьюдента, ( $t_{p,f}$ )	2,228
8	Лінійність	лінійний
9	Вірогідність (P), %	95,0
10	Стандартна невизначеність, %	9,58

Отримані результати свідчать, що час виходу піку при проведенні 10 повторних визначень суттєво не відрізнявся від часу виходу піку градувальних і контрольних розчинів, площа піку коливалася в таких самих межах. Різниця концентрації виходу компоненту між трьома паралельними результатами становила 1,47-4,02%, що допускається методикою і не перевищує 5,0%.

Згідно отриманих валідаційних результатів стандартне відхилення SD становить 4,79 мг/л, відносне стандартне відхилення RSD – 4,98%, що задовольняє вимогу не більше 5,0% при даному виді досліджень. Також згідно цього критерію оцінювання RSD не > 5% результати, отримані методом капілярного електрофорезу вважаються збіжними.

При встановленні лінійності методу було розраховано відносне стандартне відхилення RSD для фактору відгуку приладу, яке не перевищує 20 % і метод вважається лінійним. Точність методу розраховали на основі результатів 6 повторних визначень і отримали значення 98,8%, яке задовольняє вимогу «Положення про валідацію» для даного виду визначень – Т (RP) у межах 97-103%. За допомогою коефіцієнту Стьюдента обчислено довірчий інтервал для  $X_{\text{сер}}$  при  $\alpha = 5\%$ ,  $n = 10$ , який становить 85,53-106,87 мг/л.

Стандартна невизначеність методу становить 9,58 %, що задовольняє вимогу не більше 10,0%. Оцінювання карти Шухарта було проведено за правилами Westgard для оцінки внутрішньо-лабораторного контролю і охарактеризований за критерієм – один результат в серії вийшов за межі  $X_{\text{сер}} \pm 2\sigma$ , що означає попереджувальний сигнал. Такий результат вважається дійсним.

Карти Шухарта зручні для побудови та візуальної інтерпретації, проте вони погано виявляють мінімальну систематичну помилку. Тому, для вирішення цієї проблеми використовуються карти кумулятивних сум. Отримані результати 10 повторних визначень вмісту МНА-Са<sup>2+</sup> у кормовій добавці метіоніну гідроксианалогу оцінено за критерієм – точки карти зміщуються вгору під постійним невеликим кутом до осі X: поточне середнє значення відрізняється від встановленого (атестованого) значення. Така ситуація припустима.

При інтерпретації результатів валідації було застосовано критерії оцінювання, які зазначені в «Положення про валідацію» ВЦ ДКДКІ ветпрепаратів та кормових добавок, розробленого на основі Директиви Ради Європи 96/23/ЕС стосовно виконання аналітичних методів та інтерпретації їх результатів [5].

Врахувавши наважку, кількість і коефіцієнти розведень отримано результати вмісту МНА-Са<sup>2+</sup>, середнє арифметичне яких становить 96,2%, що на 0,8% нижче, ніж задеклароване значення. При проведенні перерахунку на активний метіонін, отримуємо 84,2%, що відповідає задекларованому вмісту і не перевищує похибки, яка зазначена в методиці дослідження.

## ВИСНОВКИ

1. Отримані результати досліджень свідчать, що метод капілярного електрофорезу за допомогою приладу “Капель-105/105М” є достатньо точним та вірогідним у випадку досліджень кормових добавок метіоніну гідроксианалогу за вмістом основної діючої речовини і коливається в межах 5 %, яка передбачена методикою.

2. Валідаційні дані задовольняють вимоги нормативних документів щодо валідації методик. Метод є лінійним та збіжним, відносне стандартне відхилення не перевищує 5,0%, а стандартна невизначеність становить 9,58%, що не перевищує 10%.

3. Отже, метод капілярного електрофорезу за допомогою приладу “Капель-105/105М” є альтернативним методом і за своїми характеристиками може застосовуватися при контролюванні якості кормових добавок метіоніну гідроксианалогу за вмістом основної діючої речовини.

**Перспективи подальших досліджень.** Буде впроваджено і валідовано метод капілярного електрофорезу для визначення макроелементного складу кормів і кормової сировини.

### CONTROL OF METHIONINE HYDROXYANALOG CONTENT IN FEED ADDITIVES BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS

*I. Y. Kotsiumbas, T. R. Levytskyj, H. P. Ryvak*

State Scientific Research Control Institute of Veterinary Medicinal Products and Feed Additives,  
11, Donetska str., Lviv, 79019, Ukraine

### S U M M A R Y

The results determine methionine hidroksyanalog content in feed additives by capillary electrophoresis using the instrument "Capel-105 / 105M" equipped with special software from the PC. Implementation of the method is especially important due to the constant replenishment of new market Ukraine amino acid feed additive and the increase in cases of fraud. Validation and research results, analysis and conclusions presented in the article show that the method using capillary electrophoresis instrument "Capel-105 / 105M" is an alternative method and its characteristics can be used for quality control of feed additives methionine hidroksyanalog the contents of the main active ingredient .

**Keywords:** FORAGE ADDITIONS, METHIONINE HIDROKSYANALOG, CAPILLARY ELECTROPHORESIS, VALIDATION.

### КОНТРОЛЬ СОДЕРЖИМОГО МЕТИОНИНА ГИДРОКСИАНАЛОГА В КОРМОВЫХ ДОБАВКАХ МЕТОДОМ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФЕРЕЗА

*И. Я. Коцюмбас, Т. Р. Левицкий, Г. П. Рывак*

Государственный научно-исследовательский контрольный институт ветеринарных  
препаратов и кормовых добавок  
ул. Донецкая, 11, г. Львов, 79019, Украина

### А Н Н О Т А Ц И Я

В статье поданы результаты определения содержания гидроксианалога метионина в кормовых добавках методом капиллярного электрофореза с помощью прибора «Капель-

105/105М», оснащенного специальным программным обеспечением на базе персонального компьютера. Внедрение метода является особо актуальным в связи с постоянным пополнением рынка Украины новыми аминокислотными кормовыми добавками и увеличением случаев их фальсификации. Валидационные данные, результаты исследований, их анализ и выводы свидетельствуют о том, что метод капиллярного электрофореза с помощью прибора «Капель-105/105М» является альтернативным методом исследований и по своим характеристикам может быть использован при контроле качества кормовых добавок метионина гидроксианалога по содержанию основного действующего вещества.

**Ключевые слова:** КОРМОВЫЕ ДОБАВКИ, МЕТИОНИН ГІДРОКСИАНАЛОГ, КАПИЛЛЯРНЫЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ, ВАЛИДАЦИЯ.

#### Л І Т Е Р А Т У Р А

1. *Комаров Н. В., Каменцев Я. С.* Практическое руководство по использованию системы капиллярного электрофореза «Капель». Санкт-Петербург, 2008. — 208 с.

2. М 04-63-2010 «Кормовые добавки. Методика измерений массовой доли лизина моногидрохлорида, метионина, треонина, триптофана методом капиллярного электрофореза с использованием системы капиллярного электрофореза «Капель-105/105М», Санкт-Петербург, 2010. (Свидетельство № 04.04.045/2010 от 14.04.2010 аттестации методики метрологической службой).

3. *Венедиктов А. М., Ионас А. А.* Химические кормовые добавки в животноводстве: Справочная книга. — М.: Колос, 1979. — С. 44–59.

4. *Тараненко Г. А.* Лизин и метионин в кормлении // Животноводство. — 1974. — № 1. — С. 43–44.

5. Директива Ради 96/23 ЄС від 12 серпня 2002 року щодо застосування аналітичних методів та інтерпретація результатів.

**Рецензент** — В. О. Величко, д. вет. н., ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок.